ESTUDIOS DE AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO DE UN COMPLEJO GLICOPROTEICO DE PASTEURELLA MULTOCIDA

Yolanda de Navarro*, Gerardino Cortés A., Milver Rojas y Oscar Robin.
* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490 - Santafé de Bogotá.

Keywords: P. multocida, Hemorrhagic Septicemia, Shipping fever, glycoproteins, Inmunodifusión.

RESUMEN

Mediante la extracción con solución de NaCl 2.5% (p/v) a 47° C, se obtuvo un complejo glicoproteíco de ***Pasteurella multocida*** que fue parcialmente purificado mediante filtración por gel usando Sephacryl S-200. Las fracciones 1, 2 y 3 presentaron líneas de precipitinas en inmunodifusión contra sueros hiperinmunes de conejos inoculados con extracto salino 2.5% (P/V) a 47° C y 66° C. Por electroforesis SDS-PAGE. se determinaron bandas de proteínas con pesos moleculares entre 98.800 y 17.700 daltons. La fracción 1 y el extracto salino crudo a 47° C se utilizaron como antígenos adsorbidos en gel de $Al(OH)_3$ y con ellos se efectuaron ensayos de protección en ratones, teniendo como referencia la vacuna comercial contra Septicemia Hemorrágica producida por VECOL S.A. Mediante el método estadístico de Reed Muench se estableció el índice de protección y se encontró que todos los antígenos fueron considerados protectores, siendo la fracción 1 la de mayor índice de protección con una dosis inferior.

ABSTRACT

A glycoprotein complex from **P. multocida** extracted with NaCl 2,5% (W/V) at 47° C. The protein was partially purified by gel filtration using Sephacryl S-200. Fractions 1, 2 and 3 showed precipitin lines in inmunodifusion against hyperinmune serum from rabbits inoculated with saline 2.5% (W/V) at 47 °C and 66 °C. Several protein bands, with molecular weights between 98.800 and 17.700 were obtained using SDS-PAGE.

Fraction 1 and the crude saline extract at 47° C were used as antigens adsorbed in a $Al(OH)_3$ gel and protection mice assays were performed.

As a reference the commercial vacune against Hemorrhagic Septicemia produced by VECOL S.A.

The protection index was calculated using the Reed Muench statistical method. The results showed that all antigens were protective but the highest protection index was obtained for fraction 1 with the smallest dose.

INTRODUCCION

La **P. multocida** tiene un espectro muy amplio de hospederos animales, como invasor primario y único es la causa directa de Septicemia Hemorrágica, cólera aviar y fiebre de transporte y como invasor secundario de mastitis y afecciones respiratorias que agravan los cuadros clínicos (1).

Las pérdidas económicas ocasionadas por esta bacteria son considerables; es así como en Estados Unidos se estimaron pérdidas de 25 millones de dólares anuales por sólo fiebre de transporte (2) y en Colombia se han reportado pérdidas de 800 millones de pesos anuales por mastitis en bovinos (3). El uso de vacunas con microorganismos vivos e inactivados en diferentes adyuvantes ha presentado enormes inconvenientes al no ofrecer buena inmunidad y causar reacciones anafilácticas que en algunos casos son fatales (4). Estudios preliminares realizados por Carter et. al. (5) afirman la presencia de compuestos de tipo polisacárido con caracteristicas antigénicas. Posteriormente se reportó la presencia de lipopolisacaridos (LPS) (6) en los extractos antígenicos pero con un efecto protector débil que en ocasiones causaban fuertes reacciones tóxicas. Investigaciones realizadas por Rebers et. al. (7) con antígenos solubles mostraron la presencia de compuestos glicoproteícos como responsables de actividad protectora y descartaron la presencia de lipopolisacáridos (LPS). Concientes de la gran importancia de la vacunación para prevenir la pasteurelosis en Colombia, en este trabajo se determinaron las mejores condiciones de extracción, fraccionamiento y efecto protector del complejo glicoproteíco (8).

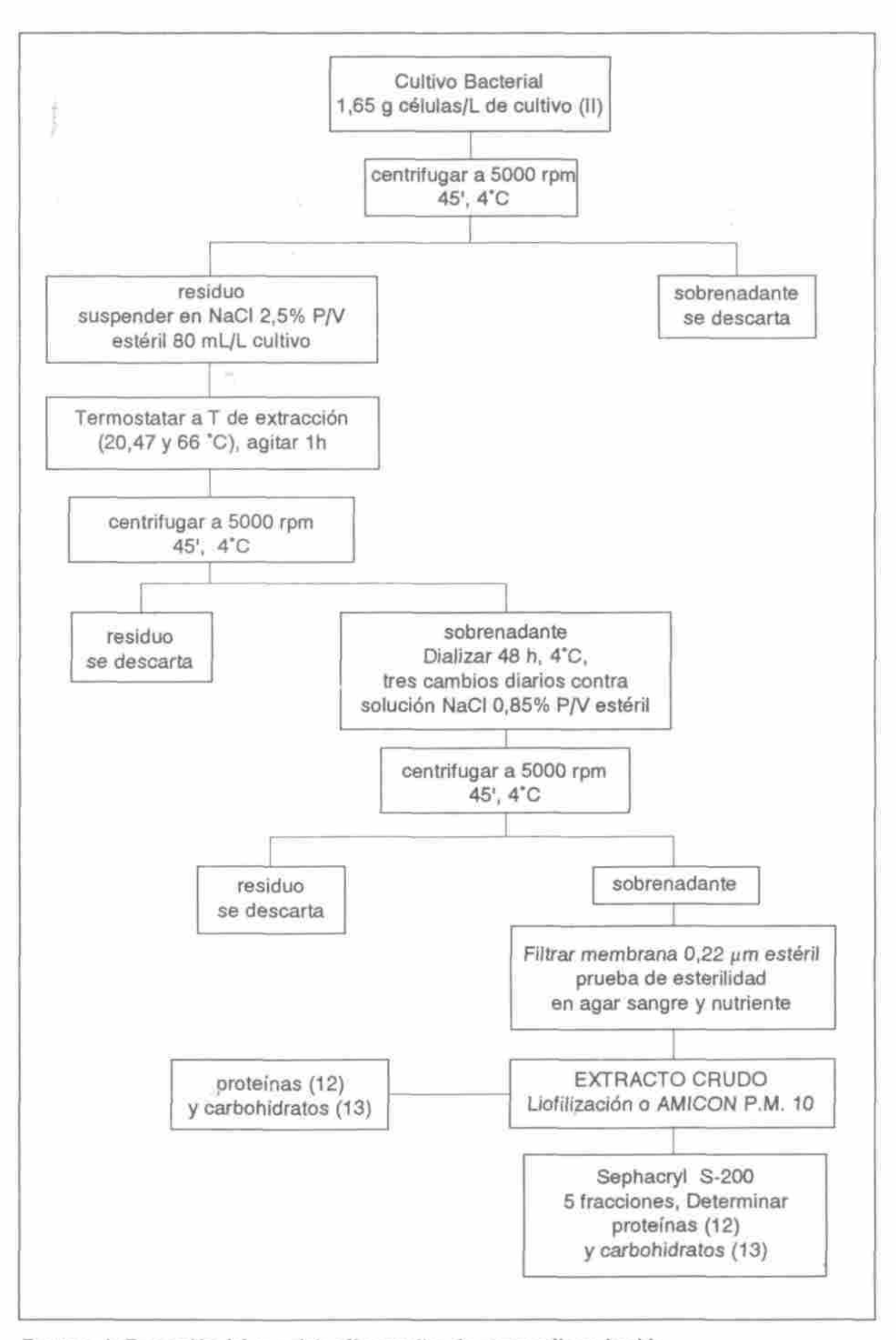
MATERIALES Y METODOS

Caracterización de P. multocida: Se utilizó la cepa 365 cultivada en un medio líquido compuesto de proteína refinada, extracto hidrolizado de caseína, extracto de levadura, polipeptonas de carne y sacarosa pH=7.0 - 7.2, con aireación entre 90 - 150 L/min,, agitación entre 90 - 150 rpm. 37 °C durante 24 o 30 horas. Este cultivo fue proporcionado por VECOL S.A. de los lotes empleados para la producción de vacuna contra Septicemia Hemorrágica y vacuna triple; se realizaron cultivos en agar sangre y agar nutriente a 37 °C por 24 horas para realizar las pruebas de pureza como se indica en Baker (9) y Bryan (10).

Extracción del complejo Glicoproteíco: De acuerdo con el esquema I se realizó la extracción del complejo glicoproteíco empleando NaCl 2.5% (p/v) y diferentes temperaturas 20, 47 y 66 °C. Además se efectúo una segunda extracción utilizando NaCl 0.4% (P/V) (solución hipotónica), 47 °C y lisis bacterial por congelación y descongelación pero el resto de etapas fueron iguales. Los extractos crudos se sometieron a liofilización o a filtración a través de AMICON, membrana P M 10.

fraccionamiento de los extractos crudos (E.C.): Se fraccionaron en una columna de Sephacryl S-200 (70 X 2.6 cm) equilibrada con NaCl 1% (P/V). Se eluyó con Buffer de fosfato 0.01 M, pH 6.8 empleando velocidad de flujo de 5 mL/h. Se colectaron fracciones de 2.5 mL a 4 °C. Se realizaron los perfiles de elución determinando absorbancia a 280 nm.

La metodología empleada para la extracción y fraccionamiento del complejo glicoproteíco se basó en los reportes de Kodama et. al. (14) y Syuto et.al. (15) con algunas modificaciones.



Esquema 1: Extracción del complejo glicoprotéico de *pasteurella multocida*

Obtención de Sueros Hiperinmunes: Conejos blancos adultos fueron inoculados subcutaneamente con vacuna contra septicemia hemorrágica (VECOL) o con antígenos preparados con los extractos realizados a 47 y 66 °C y con NaCl 2.5% (P/V). Los antígenos se adsorbieron en gel de hidróxido de aluminio 10% (V/V), pH 7.2 ajustado con glicina 0.2M, pH 10.4. Se realizaron 4 inoculaciones de 1.0 mL del antígeno a los respectivos ratones a intervalos de 2 semanas. Dos semanas después de la última inoculación fueron sangrados en blanco como se reporta en Garvey (16). Los títulos de los sueros fueron obtenidos por aglutinación en placa.

Ensayos de inmunodifusión: Se empleó la técnica de Ouchterlony (17), se utilizó buffer veronal (barbital sodico 0.05M, ácido barbitúrico 0.01M, pH 8.6). Los antígenos ensayados fueron, los E.C. obtenidos con solución de NaCl 2.5% (P/V), 47 °C y 66 °C; el E.C. obtenido con NaCl 0.4% (P/V) 47 °C, con las concentraciones de proteínas y carbohidratos reportadas en la tabla 1, las 5 fracciones resultantes de la filtración por gel de E.C.NaCl 2.5 %(P/V) 47 °C y la vacuna comercial contra septicemia hemorrágica de VECOL. Todos los antígenos ensayados fueron concentrados por AMICON PM10. De cada uno de los antígenos se aplicaron diferentes diluciones. La observación de las líneas de precipitinas fue realizada 72 horas después de aplicadas las muestras, en cámara oscura como reporta Morilla (18).

Electroforesis: Se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli (19) con las modificaciones de Pharmacia (20) y con urea 2M como denaturante; geles de poliacrilamida de concentración T 4 C 2.7 en buffer Tris HCl 0.55 M. glicina 0.384 M y SDS 0.1% pH 8.3 y gel de separación T 12.6 C 2.7. Se corrieron a 180 voltios, 40 mA durante 6 horas. Se tiñó con azul de coomasie R 250 según Pharmacia (20) y con plata amoniacal (21). Se colocaron 30 μl de las mismas muestras utilizadas en el ensayo de inmunodifusión, además se colocaron muestras de membranas bacteriales preparadas con la técnica de Osbord (22), los medios de cultivo inoculado por **P. multocida** y sin inocular y patrones de peso molecular (P.M.) entre 14.000 y 94.000 daltons.

Tabla 1. Comparación del contenido de proteína y carbohidratos de los E.C. en NaCl al 2.5 y 0.4%

% P/V NaCl °C	TEMPERATURA DE EXTRACCION	PROTEINAS Conc. μg/mL	PROTEINAS % P/P res. P.Seco de células	CARBOHIDRATOS Conc. μ g/mL	CARBOHIDRATOS % P/P res. P.Seco de células	RELACION CARBOHIDRATO / PROTEINA
	66	203.9	1.0	128.7	0.6	0.63
2.5	47	474.7	2.3	68.5	0.3	0.14
	20	177.0	0.9	15.5	0.1	0.09
0.4	47	4791	23.1	600.0	2.9	0.13

Test de protección: Se realizó un ensayo comparativo inoculando intraperitonealmente 3 grupos de 100 ratones con: 1) 0.25 mL de vacuna comercial contra septicemia hemorrágica; 2) 0.25 mL de antígeno elaborado con E.C. a 47 °C con NaCl 2.5% (P/V); 3) 0.25 mL de antígeno elaborado con la fracción 1 obtenida de la cromatografía. La dosis de antígeno aplicada fue la correspondiente al peso seco de células de una dosis de la vacuna VECOL (425 g) lo que correspondió a 11 µg de proteína para el E.C.y 0.94 µg de proteína para la fracción 1. Los antígenos fueron suspendidos en gel de hidróxido de aluminio al 10% (V/V), pH 7.4 y verificada su esterilidad. Los animales fueron vacunados y observados durante 21 días sin presentar ningún cambio en su comportamiento y estado general lo cual indicó la inocuidad de los antígenos. Después de 23 días, los ratones fueron desafiados con **P.multocida** viva cepa 365, previamente virulentada mediante inoculación en ratas y cultivo de sangre del corazón de los animales enfermos (23). Se emplearon para el desafío diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-10} de la cosecha de **P.multocida** virulentada y 10 ratones para cada dilución. Se utilizaron también 5 ratones control, no vacunados para cada dilución de acuerdo con el reporte técnico de VECOL (23). Los ratones fueron observados 2 veces por día durante 12 días y se determinó el número de animales muertos por cada vacuna. Los animales que permanecieron enfermos a los 12 días fueron considerados muertos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización de las Bacterias y pruebas de pureza: Los cultivos de **P. multocida** se caracterizaron por su forma bacilar, un tamaño entre 0.3 - 1.3 µm de diámetro y 1.0 - 2.0 µm de largo, tinción Gram negativa, la tinción con azul de metileno reveló claramente la bipolaridad y la tinción con tinta china permitió observar la presencia de cápsulas. Estas características determinadas coincidieron con las reportadas por Krieg (24) y Baker (9) para ***P. multocida.***

Extracción del complejo Glicoproteico: Se determinó la temperatura de 47 °C como la de mayor rendimiento en la extracción de proteínas respecto al peso seco de células presentando un contenido de 474.7 µg/mL de proteínas y 68.5 µg/mL de carbohidratos. La relación carbohidrato/proteína fue de 0.14 (tabla 1) la cual permaneció constante en las diferentes extracciones a la temperatura respectiva. En este ensayo se observó además que el contenido de carbohidratos es mayor al aumentar la temperatura de extracción posiblemente por hidrólisis de los azucares presentes. Esto no ocurrió en el caso de proteínas que comenzaron a ser desnaturalizadas a una temperatura de 66 °C. Cuando se utilizó como extractante NaCl 0.4% (P/V), el contenido de proteínas fue de 4.791 µg/mL que corresponde a 23.1 %(P/P), respecto al peso seco de células, y de carbohidratos 600 µg/mL que corresponde a 2.9% (P/P) respecto al peso seco de células. resultados muy superiores a los obtenidos cuando se utilizó como extractante NaCl 2.5% (P/V). La relación carbohidrato/proteína en la extracción con NaCl 0.4% (P/V) fue de 0.13. En este ensayo la extracción con solución salina hipotónica incrementada por la acción física del proceso de congelación y descongelación condujo a una lisis bacterial, como se reporta en Morilla (18) la cual fue verificada por no presentar crecimiento en medio de cultivo de agar sangre a 37 °C durante 48 horas. Esta lisis permitió la extracción de todo el contenido proteíco citoplasmático lo que no ocurrió en la extracción con solución salina hipertónica donde posiblemente se extraen proteínas que pueden atravesar los poros de la membrana bacterial, en este caso no hubo lisis bacterial puesto que presentó crecimiento en el cultivo con agar sangre a 37 °C por 48 horas.

Fraccionamiento de los extractos crudos: El E.C. NaCl 2.5% (P/V)de acuerdo con el esquema I y concentrado a través de AMICON PM 10 mostró un perfil de elución muy semejante a los obtenidos en estudios anteriores por Syuto et. al. (15) donde se observaron 5 fracciones claramente definidas como se muestra en la gráfica 1 parte A. Estas fracciones fueron caracterizadas por inmunodifusión y electroforesis. Para el E.C. NaCl 2.5% (P/V) que fue previamente liofilizado. el perfil obtenido mostró 3 fracciones de proteínas de las cuales la última presentó mayor absorbancia a 280 nm (gráfica 1 parte B), este perfil difirió con el extracto que no fue liofilizado sino concentrado por AMICON. Los resultados anteriores y la disminución del contenido de proteínas en un 50% durante el proceso de liofilización nos indicó que posiblemente en este segundo proceso se produjo desnaturalización y/o degradación de proteínas. Con respecto al E.C. NaCl 0.4% (P/V) 47 °C, el perfil obtenido mostró gran cantidad de fracciones no definidas, con muy poca resolución y muy diferentes a los perfiles encontrados en estudios anteriores, debido a que contenía muchas de las proteínas citoplasmáticas.

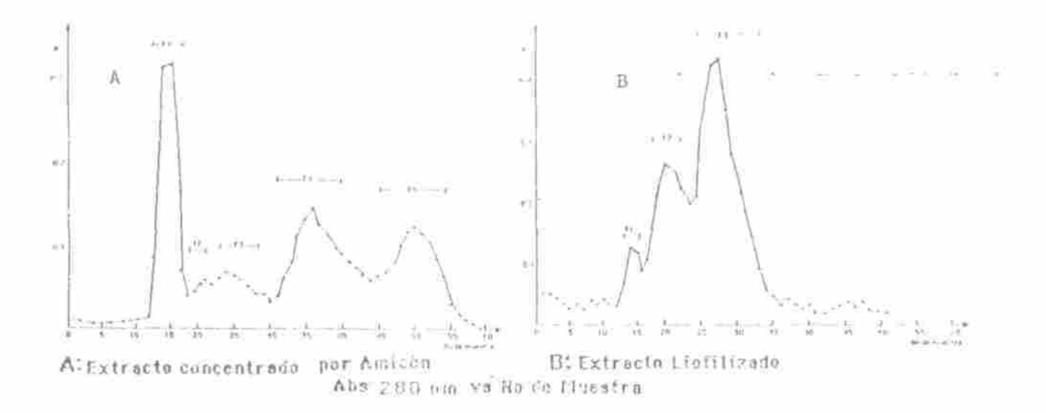
Sueros Hiperinmunes: Los títulos de todos los sueros obtenidos utilizando los antígenos mencionados en Materiales y Métodos presentaron un valor de 1:400 después de las 4 inoculaciones. Con estos sueros se realizaron los ensayos de inmunodifusión.

Tabla 2. Ensayo de inmunodifusión con los diferentes extractos de *Pasteurella multocida* cepa 365

Anticuerpo / Antígeno	Antisuero Vacuna comercial VECOL	Antisuero E. C. 47 °C 2.5% (P/V)	Antisuero E. C. 66 °C 2.5% (P/V)
Extracto 2.5% (P/V) 47 °C	-	+	+
Extracto 2.5% (P/V) 66 °C	-	+	+
Extracto 0.4% (P/V) 47 °C	-	+	+
Vacuna comercial para septicemia	-	-	-
Fracción 1 de la columna	-	+	+
Fracción 2 de la columna	-	+	+
Fracción 3 de la columna	-	+	+
Fracción 4 de la columna	-	-	-
Fracción 5 de la columna	-	-	-

+ formación de líneas precipitinas

- Ausencia de líneas precipitinas



Gráfica 1. Cromatografía del E.C. NaCl al 25% p/v a 47 °C

Ensayos de Inmunodifusión: Los resultados se muestran en la tabla 2. Los antisueros obtenidos con los extractos realizados con NaCl 2.5% (P/V) a 47 °C y 66 °C presentaron varias líneas de precipitación cuando se enfrentaron con sus respectivos extractos y con el extracto realizado a la otra temperatura (reacción cruzada), lo cual indicó la posible presencia de más de un compuesto antigénico y al menos uno de ellos fue similar en los dos extractos. Cuando se utilizó como antígeno el extracto NaCl 0.4% (P/V)a 47 °C frente a los antisueros de 47 °C y 66 °C se observaron también varias líneas de precipitación ocasionada por diferentes compuestos antígenicos de los cuales uno de ellos presentó reconocimiento de identidad. Además estos antisueros enfrentados contra las diferentes fracciones mostraron líneas de precipitación únicas, muy claras y semejantes, indicando la presencia de un solo antígeno en las fracciones 1, 2 y 3 mientras que las fracciones 4 y 5 no presentaron líneas de precipitación con ninguno de los antisueros posiblemente por que en estas últimas fracciones no están presentes proteínas antigénicas o se encuentran en muy baja concentración.

Con respecto al antisuero obtenido con la vacuna comercial contra septicemia hemorrágica cabe destacar en primer lugar que no se observaron líneas de precipitación al enfrentarse con los diferentes antígenos, dicho resultado posiblemente se debe a una baja concentración de anticuerpos en el antisuero (título 1:400), y en segundo lugar para estos ensayos se utilizaron como antígenos las bacterias de ***P. multocida*** inactivadas las cuales por su tamaño no podían migrar a través del gel, en consecuencia no se observó la unión antígeno-anticuerpo.

Electroforesis: Se observó que el proceso de cromatografía realizado si fraccionó y purificó parcialmente los extractos crudos pues en las fracciones se presentaron pocas bandas de proteínas contra aproximadamente 14 que mostró el E.C. con NaCl 2.5%(P/V) 47 °C y 25 bandas que estaban presentes en el E.C. NaCl 0.4% (P/V) 47 °C. La evaluación electroforética permitió determinar que las bandas de proteínas son: La fracción 1: Presentó 6 bandas de proteínas con P.M. entre 98.800 y 31.000 daltons, la fracción 2: 5 bandas de proteínas con P.M. entre 74.000 y 34.000 daltons, la fracción 3: presentó 8 bandas de P.M. entre 64.000 y 17.700 daltons. En las fracciones 4 y 5 no se observaron bandas de proteínas lo cual confirmó los resultados obtenidos en inmunodifusión donde tampoco se presentó recono-

cimiento antígeno-anticuerpo. Se encontraron bandas comunes discriminadas así: Una banda de 40.000 daltons en las fracciones 1, 2. 3, en el lisado de membranas y en el medio de cultivo inoculado; esta banda fue reportada como antigénica en investigaciones de Lugtemberg (25). El medio de cultivo inoculado presentó bandas comunes con los E.C., lo que permitió establecer que la bacteria secreta al medio proteínas antigénicas coincidiendo este resultado con el reportado por Srivastava (26).

Investigaciones al respecto de Syuto (15), Lugtemberg (25), Rimler (27), fueron consideradas antigénicas bandas de proteínas con pesos moleculares de 74, 44, 40, 31 y 25 Kdaltons, de las cuales se encontraron en el presente estudio, la banda de 40 Kd en las fracciones 1, 2 y 3, la banda de 31 Kd en la fracción 1. Al comparar nuestros resultados electroforéticos con los reportados podemos considerar que las 3 fracciones de la cromatografía tienen actividades antigénicas, siendo la fracción 1 la que tiene mayor número de esta proteínas reportadas.

Determinación de la relación carbohidrato/proteina: Las fracciones 1, 2 y 3 fueron evaluadas en su contenido de proteínas, carbohidratos, porcentaje P/P de proteínas con respecto al extracto crudo y la relación carbohidrato/ proteína. Los resultados se presentan en la tabla 3. Las relaciones carbohidrato/proteína de las fracciones 1 y 2 fueron de 1.15 y 1.50 respectivamente. La relación de la fracción 2 se encuentra muy cercana a la obtenida por Syuto et.al. (15) con la cepa 1059 que fue de 1.44. Sin embargo en la fracción 1 se determinó una relación relativamente cercana pero además presentó el mayor número de proteínas antigénicas y por estas razones se seleccionó para el ensayo de protección. En la tabla 4 se presentan los resultados para este ensayo.

Test de protección: La virulencia de la cepa 365 se demostró por la gran mortalidad de los controles, no vacunados la cual fue del 100% hasta la dilución 10^{-9} y descendió al 60% en la dilución 10^{-10} donde sólo se encontraban 2 unidades formadores de colonias por dosis. La mortalidad que presentaron los ratones vacunados con la vacuna comercial de VECOL, contra septicemia hemorrágica, el E.C. NaCl 2.5 (P/V). 47 °C y la fracción 1 de la cromatografía fue del 65%, 63% y 61% respectivamente, siendo la fracción 1 la de menor mortalidad con menor concentración de proteina.

La medida del grado de protección se determinó por el índice de protección (I.P) que se define como log DL50 vacunados (Dosis letal) menos log DL50 de controles, diferencia que

Tabla 3. Contenido de Carbohidratos y Proteinas en las Fracciones 1. 2 y 3

DETERMINACION	PROTEINAS		CARBOHIDRATOS		RELACION
Fracción	Conc. µg/mL	% P/P respecto a proteínas del E. Crudo	Conc. µg/mL	% P/P respecto a carbohidratos del E. Crudo	CARBOHIDRATO / PROTEINA
1	53.8	8.5	62.0	56.6	1.15
2	23.4	1.1	35.2	9.4	1.50
3	48.8	1.9	25.7	5.8	0.53

debe ser mayor a +2 para considerarse antígeno protector, (23). Para determinar los valores de log DL50 se recurrío al tratamiento estadístico de Reed Muench, reportado por Astudillo (28); los resultados se muestran en la tabla 5, Con el fin de conocer el verdadero alcance de los antígenos en materia de protección; en este trabajo, no se colocó adyuvante oleoso, como se ha realizado en otros estudios (29) y además sólo se aplicó una dosis de antígeno antes de ser desafiados.

Los 3 antígenos ensayados: La vacuna comercial VECOL, el E.C. NaCl 2.5% (P/V) 47 °C y la fracción 1 presentaron índice de protección de +3.1. +3.3 y +3.6 respectivamente los cuales fueron superiores al valor límite +2 por lo tanto los 3 antígenos se consideran protectores. El hecho de que con dosis mucho más pequeñas de proteínas la fracción 1 (0.94 μg por dosis) se obtenga un mayor índice de protección (+3.6) confirma que en esta fracción se encuentra más purificado el antígeno y proporciona la posibilidad de obtener vacunas solubles más efectivas y que eliminen las reacciones secundarias de las vacunas tradicionales.

Tabla 4. Resultados del Ensayo de Protección Después de 12 Días de Desafiados los Ratones.

Dilución cepa de descarga *P. multocida*	Unidades formadoras de colonias/ dosis	N° ANIMALES MUERTOS / N° TOTAL DE INOCULADOS			
		Vacuna comercial	Antígeno con E.C. 2.5% v/v NaCl 47°C	Antígeno con fracción 1 de cromatografía	controles no vacunados
10^{-1}	2.125 $X10^{9}$	10/10	10/10	10/10	5/5
10^{-2}	2.125 $X10^{8}$	7/10	10/10	10/10	5/5
10^{-3}	2.125 $X10^{7}$	9/10	9/10	8/10	5/5
10^{-4}	2.125 $X10^{6}$	8/10	9/10	9/10	5/5
10^{-5}	2.125 $X10^{5}$	6/10	7/10	6/10	5/5
10^{-6}	2.125 $X10^{4}$	7/10	6/10	9/10	5/5
10^{-7}	2.125	8/10	7/10	5/10	5/5
10^{-8}	212	5/10	5/10	4/10	5/5
10^{-9}	21	5/10	0/10	0/10	5/5
10^{-10}	2	0/10	0/10	0/10	3/5
GRAN TOTAL		65/100	63/100	61/100	48/50

Los animales enfermos a la fecha fueron considerados muertos.

Tabla 5. Resultados del Tratamiento Estadistico Realizado al Test de Protección.

	log DL50	SDL50	LCDL50	LP
Controles	-10.3	NH	NH	--
Vacuna comercial VECOL S.A.	- 7.2	0.52	-6.2y -8.2	+3.1
Extracto 2.5% p/v NaCl 47 °C	- 7.0	0.44	-6.2y -8.2	+3.3
Fracción 1 de la columna	- 6.7	0.44	-5.9y -7.5	+3.6

NH No es posible hallarlo con los datos obtenidos
SOL50: Error típico
IP: Indice de protección
DL50: Dosis letal 50%
LC DL50: Límite de confianza

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia, a la Empresa Colombiana de productos veterinarios VECOL S.A. y al Instituto de Biotecnología por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1 Collins, C.; Grange."Isolation and identification of microorganismos of medical and veterinary importance" Academic Press, New York, U.S.A. **1985**, 43-51

2 Acha, P. N., Szyfres, B., "Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales" 2ª edición, Organización Panamericana de la Salud, O.M.S. Washington D. C. U.S.A. **1986**, 142-147.

3 Peña, N., "Las Enfermedades de los Animales en Colombia" Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá, D.E. Colombia. **1980.**

4 Dua, S. K.; Maheswaran, S. K., "Studies on ***pasteurella multocida*** VI nature of sistemate inmunity and analysis of the correlation betwen Lavels of inmunity induced by vaious fowl cholera vaccines and protection agains challenge" Av. Dis. **1978**, 748-764.

5 Carter, G. R.; Annau, E., "Isolation of capsular polisacharides from colonial variants of ***pasteurella multocida***" A.M.J. Vet. Res. **1953**. 14,475-478.

6 Baba, T. "Cell mediated inmunoprotection chickents against ***pasteurella multocida***" Res.Vet.s.c. **1984**, 36:225-230.

7. Rebers, A. P.; Heddleston, K. L.; Rhoades, K. R., "Isolation from *pasturella multocida* of lipopolisaccharide antigen with inmunizing and toxic properties" *J. Bac.* **1967**, 93, 7-14.

8 Cortés, G.; Rojas, M., "Estudios de aislamiento y purificación de un complejo glicoproteíco de ***P.multocida***" Tésis de Químico Farmaceútico, UniversidadNacional de Colombia, Bogotá. **1990**.

9 Baker, F. S.; Breach, M. R., "Manual de Técnicas Bacteriológicas" 2ª Ed. Acribia, Madrid, España. **1970**, 302-305.

10 Bryan, Bryan, "Bacteriología: Principios y Práctica" Compañia Editorial Continental S.A., Mexico. **1982**, 88-90.

11 Sierra, Y.; Acosta, R., "Estandarización y optimización de un medio de cultivo industrial para fermentación acetobutílica por métodos estadísticos" Tesis químico farmaceútico, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. **1988**.

12 Lowry, O. H.; Rosembrough, N. J; Farr, L. A.; Rondall, R. J., *J. Bioch.* **1961**,193,265-270.

13 Bubois, M; Gilles, K. A; Hamilton, J. K.; Rebers, A. P.; Smith, F., *Analitycal chem.* **1956**, 28, 350-356.

14 Kodama, A. M.; Matsumoto, M.; Snow. L. M., *Am. J. Vet.res.* **1981**, 42,1838-1841.

15 Syuto, B.; Matsumoto, M., *Infec. Imm.* **1982**, 37,1218-1226.

16 Garvey, F. S., "Methods in Inmunology" 3ªEd, W.A. Benjamin, Masachusetts, U.S.A. **1977**.

17 Ouchterlony, O., "Handbook of Inmunodifusión and Inmunoelectroforesis" 6ªEd, A.N.N. Arbar Science publishers INC. **1973**.

18 Morilla, A. B., "Manual de Inmunología" 1ªEd., Diana S.A, Mexico. **1986**. 24-62

19 Laemmli, U. K., *Nature*. **1970**, 227, 680-685.

20 Pharmacia, "Poliacrylamide Gel Electroforesis" Laboratory tecniques, laboratory separation división, Uppsala, Suecia. **1984**. 28-30.

21 Silva, M. I., "Relación entre actividad de la galactosa 1-uridil transferasa en la membrana del eritrocito y la capacidad de aglutinación de este con la favina" Tesis de Magister Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. **1989**.

22 Osborn, M.J.A.I. Munson, "Methods in Enzimology". **1984**, 31A, 642-653.

23 Equipo Técnico de VECOL S.A., "Manual Técnico de Control de Calidad *Pasteurella multocida*", VECOL SA, Bogotá, Colombia. **1988.**

24 Krieg, R.; Holt, G. J., "Bergey S. Manual of Sistematic Bacteriology Vol I Williams Wilkins, Baltimore U.S.A **1984,** 550-557.

25 Lugtemberg, B.; Boxtel, R. V.; Evemberg, D.; Jong, M. G.; Storm, P., *Int. Imm*. **1986**, 52,175-181.

26 Srivastava, K. K.; Foster, W. J., *Can. J. Microbiology*. **1976,**23, 197-201.

27 Rimler, R. B.; Rhoades, K. R. *Av. Dis*. **1989**, 88, 250-260.

28 Astudillo, U.; Wanderley, M., "Métodos Estadísticos para Ensayos Biológicos" Organización Panamericana de la Salud, Centro Panamericano de fiebre aftosa, Rio de Janeiro, Brasil. **1976**, 1-37,

29 Heddleston K. L.; Rebers A. P.; Ritchie, A. E. *J. Imm*. **1965**, 96, 124-133.